云 南 植 物 研 究 2010，Suppl. XⅦ：74～80
Acta Botanica Yunnanica

夏蜡梅遗传多样性迁地保护取样策略研究*

陈香波[1]，田 旗[2]
（1 上海市园林科学研究所，上海 200232；2 上海辰山植物园，上海 201602）

摘要：采用ISSR分子标记技术分析夏蜡梅天然群体的遗传多样性及空间遗传结构并在此基础上利用计算机模拟取样，以保留95％以上天然群体等位基因为标准制定出夏蜡梅遗传多样性的取样策略，即采集6个群体，群体抽样比例为30％，居群取样时应适当控制采种间距在26 m以上。采种实施迁地保护后，后代群体检测证实该取样策略能够有效保留原始群体的遗传多样性，由此探讨了濒危植物系统迁地保护的采样模式与技术措施。

关键词：夏蜡梅；遗传多样性；迁地保护；取样策略
中图分类号：Q 16　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2700(2010) Suppl. XⅦ-074-07

Study on the Sampling Strategy of *Sinocalycanthus chinensis* for *Ex-situ* Conservation of Genetic Diversity

CHEN Xiang-Bo[1]，TIAN Qi[2]
（1 *Shanghai Landscape Gardening Research Institute*，Shanghai 200232，China；
2 *Chenshan Botanical Garden*，Shanghai 201602，China）

Abstract：By analysis of genetic diversity and population genetic structure in natural populations of *Sinocalycanthus chinensis* with inter-simple sequence repeat（ISSR）technique，the sampling strategy were determined based on the gene capture curve of 95％ allele captured. The results are as follows：6 populations to be sampled，the sampling proportion should be 30％ and the distance between the sampled individuals are best of 26 m above. After seeds sampling and conduction of *Ex-situ* conservation，the genetic diversity of the off-spring population were evaluated that it conserved the genetic diversity of the natural populations effectively. Therefore，the systemic sampling method of endangered plants for *Ex-situ* conservation of genetic diversity were discussed.

Key words：*Sinocalycanthus chinensis*；Genetic diversity；*Ex-situ* conservation；Sampling strategy

植物迁地保护是指把植物的个体、器官或组织转移到自然生境之外以繁衍保存的一种保护方式，是生物多样性保护的重要辅助手段之一（许再富，1998），特别对于那些以残存种群存在或由于自然或人为原因生境条件已发生改变的濒危物种，迁地保护已成为必要且可靠的措施。濒危植物迁地保护时，简单的从一个地方采种或者保存个别单株，很难达到遗传多样性保护的目的，后代群体遗传代表性不强，而目前多数植物园收集保存濒危植物均存在此问题（康明等，2005；Li等，2002），不能算是成功的保护。采用遗传多样性迁地保护模式，在调查天然群体遗传多样性基础上制定相应的采样策略并实施引种，以最少的数量保存尽可能多的原有群体的遗传多样性，被认为是一条科学而可行的保护途径（金燕和卢宝荣，2003）。采样策略关系到迁地保护的完整性和

* 基金项目：国家环保部专项“中国重要观赏植物种质资源调查”（物种08-二-3-1）、上海市绿化和市容管理局项目“夏蜡梅引种及栽培应用技术研究”（G060208）
作者简介：陈香波（1972－）女，博士，高级工程师。主要研究方向：园林植物资源与生物技术。

有效性，但目前许多工作还只是随机引种以及分析评价已收集群体、提出进一步引种建议方面（韦霄等，2005），未能从一开始系统研究制定出收集策略再行实施，更未有对策略采样后代群体进一步跟踪评价的报道，收集保护效率普遍不高。

以国家二级保护植物、中国特有珍稀野生花卉夏蜡梅为例（郑万钧和章绍尧，1964），目前国内只在武汉、杭州等少数植物园做零星收集，天目山自然保护区虽已人工繁殖夏蜡梅，但后代群体未检测到任何多态性（周世良和叶文国，2002），说明该迁地保护仅是保存了一定数量的夏蜡梅苗木而未真正实现物种遗传多样性的有效保护。调查发现，虽然夏蜡梅分布区狭小，但群体表型变异仍很丰富（陈香波等，2010），ISSR分子标记分析显示居群间遗传多样性较高，夏蜡梅自然繁育系统以异交为主且又呈片段化分布，导致居群间强烈的遗传分化（金则新和李钧敏，2007；张文标，2007）。因此，迫切需要针对其特殊的分布及繁育特点实施遗传多样性迁地保护，制定切实的取样策略混合引种，以促使不同群体间基因交流与融合、扩展种群适生范围，实现物种的长远保护与合理利用。

本研究采用ISSR分子标记技术分析夏蜡梅天然群体的遗传多样性及空间遗传结构并在此基础上利用计算机模拟取样，通过不同取样方式对比，制定代表夏蜡梅自然居群遗传多样性的取样策略，采种实施迁地保护进一步检测后代群体的遗传代表性，由此探讨了适合夏蜡梅系统迁地保护的取样策略与实施方法，为更多濒危植物取样保护提供参照与技术借鉴。

1　材料和方法

1.1　ISSR分子标记遗传多样性数据采集与分析

选取夏蜡梅全分布区8个代表性居群（取样群体基本情况见表1）、每居群取30株个体（天台居群15株，保证株间距大于30 m），共采集255株夏蜡梅植株幼嫩叶片，经变色硅胶快速干燥处理，置于密封袋室温带回保存备用。

采用改良CTAB法提取夏蜡梅总DNA（Doyle and Doyle，1990），进行ISSR-PCR扩增并对扩增反应产物进行电泳与银染（方法参照金则新和李钧敏，2007）。

条带统计：属于同一位点的产物按扩增阳性（1）和扩增阴性（0）记录电泳带谱，形成ISSR数据矩阵。利用POPGENE v. 1.31软件（Yeh等，1999）计算多态位点百分率（*P*）、Shannon指数（*I*）和Nei′s基因多样性指数（*h*）等获得原始群体遗传多样性基础数据。

1.2　计算机模拟取样及空间自相关分析

针对群体与个体，利用PGDC1.0软件通过计算机模拟对总遗传材料分别按1、2、3、4、5、6、7、8个群体或0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7的个体抽样比例进行可重复随机抽样。在每种抽样比例下，分别进行1000次的模拟取样得到1000个模拟样本，分析表征这些样本遗传多样性的各项指标：多态位点数（A）、多态位点百分率（*P*）、群体总的基因多样度（Ht）及捕获的基因位点数，计算各指标的平均数。当捕获等位基因数占到总基因位点数的95%以上时的样本数量确定为取样的群体和个体数（李正宏等，2006）。

以横源居群夏蜡梅为研究对象，将ISSR的1、0数据视作绝对型变异，选取等位基因频率在30%～70%之间的ISSR位点，以个体间平均距离划分10个距离等级，以空间自相关系数Moran′s *I*值衡量变异的空间结构，计算公式如下：

$$I=\frac{n\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n}W^{ij}(X_i-\overline{X})(X_j-\overline{X})}{(\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n}W^{ij})\sum_{i=1}^{n}(Xi-\overline{X})^2}$$

表1　夏蜡梅居群基本情况

Table 1　Information of populations of *Sinocalycanthus chinensis*

群体编号 Population code	地点 Location	经度 Lontitude	纬度 Latitude	海拔 Altitude（m）	坡向 Slope
P1	浙江临安大明山西坑	30°02′N	118°58′E	459～659	东北坡
P2	浙江临安大明山景区	30°02′N	118°59′E	664～929	东北坡
P3	浙江临安顺溪乡横源	30°02′N	118°57′E	822～830	北坡
P4	浙江临安颊口镇前坑	30°05′N	119°01′E	599～626	西北坡
P5	浙江临安清凉峰马啸	30°08′N	118°54′E	747～767	东北坡
P6	浙江临安顺溪乡直源	30°03′N	118°56′E	715～864	东北坡
P7	安徽绩溪龙须山	30°03′N	118°41′E	854～908	东北坡
P8	浙江天台大雷山	28°59′N	120°46′E	714～725	东北坡

式中 W_{ij} 为权重，当空间一点 i 与 j 为邻接关系时，$W_{ij}=1$，否则 $W_{ij}=0$；X_i、X_j 分别为空间点 i 和 j 的数值，$\overline{X}$ 为所有点的均值，n 为样点数。

I 的期望值为 E(I)=-1/(n-1)，当 I 值为正值且显著时，说明该距离等级两点间存在相似关系，当 I 值为负值且显著时说明该距离等级两点间不存在相似关系（何敬胜等，2005），显著性检验采用标准正态偏差法进行，依据等间隔距离等级法（10 个等级）计算不同距离等级下的 Moran′s I 值，以分析居群不同分布尺度变异的空间结构，明确获取不同遗传背景材料的取样间隔距离。

1.3　采种育苗

于 2008 年 9 月下旬果实成熟期，采集上述 8 个居群夏蜡梅、每居群 20 个单株（株间距 > 30 m）、每株采集 3 个果实，共计 480 个果实 2357 粒种子，采后立即播于育苗盘内，播种基质按园土、草炭、珍珠岩＝2∶2∶1 的比例混合均匀，播后浇足水分，上覆塑料地膜以保湿。待种子真叶长出后移栽上盆，栽植土壤同播种基质。期间半月除草一次，视土壤干湿状况适量浇水，夏季高温季节来临前搭建单层遮荫网。统计每株发芽 3～12 个不等，共获得 1688 株后代植株，所有苗木均种植于上海辰山植物园科学引种苗圃内。

1.4　取样策略的评价分析

对迁地保护采自 8 个夏蜡梅居群、各 20 株夏蜡梅个体后代而建立起的人工居群，每株随机选取 1 株后代个体植株的幼嫩叶片（共计采集 160 个样本）提取总 DNA 并进行 ISSR-PCR 扩增，条带统计方法同 1.1。

以每群体采种 20 株，分别按 6、7、8 个群体等 3 个级别以及采种 8 个群体，每群体分别按 10 、20 个单株个体 2 个级别进行随机抽样，构建成不同的采种群体，利用 POPGENE v. 1.31 软件计算多态位点百分率（P）、Shannon 指数（I）和 Nei′s 基因多样性指数（h）等（每级别随机重复抽样 10 次取平均值）；计算不同采种级别下后代群体各项遗传参数，以 8 个居群、每居群 30 个单株所获得的原始群体遗传多样性参数为对照，计算不同采种策略对原始群体的保留率。

2　结果与分析

2.1　取样策略

2.1.1　取样群体样本策略　随取样群体数的增加，获得的多态性位点百分率增加，而群体总的基因多样度也在增加（表 2），捕获基因数呈现递增的趋势，8 个群体随机抽取 1、2、3、4、5、6 群体可分别达到平均捕获 78.67％、93.38％、91.91％、91.91％、94.85％、96.32％的等位基因数。保存 6 个群体的夏蜡梅可达到捕获总体等位基因的 96.32％，多态性位点百分率达总群体的 90.54％，群体总的基因多样度 Ht 占总群体的 94.12％，保存 6 个群体即可保护夏蜡梅天然群体 95％以上的等位基因。

表2　按群体随机取样群体遗传参数

Table 2　Genetic parameters of random sampling population

取样居群数 No. of sampled populations	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态性位点百分率 P (％)	群体总的基因多样度 Ht	捕获等位基因数 No. of alleles captured
1	24	28.91	0.11	107
2	44	53.01	0.16	127
3	42	50.6	0.14	125
4	42	50.6	0.14	125
5	46	55.42	0.16	129
6	48	57.83	0.16	131
7	53	63.85	0.18	136
8	53	63.85	0.17	136

2.1.2　取样个体样本策略　表 3 可知，虽个别有波动，但整体显示等位基因的捕获率随着居群取样个体数增加而呈增大的趋势。在取样比例在 0.3 即 30％时，等位基因的捕获率即已达到 97.05％，在此比例下，群体总的基因多样度（Ht）是原始群体基因多样度的 119.38％，多态性位点百分率达到原始群体的 92.45％，较好地代表了夏蜡梅天然群体的遗传多样性。因此，在实施夏蜡梅迁地保护时，抽样比例在 30％（即每居群采取 9～10 株）即可达到有效保护总体遗传多样性的目的。

表3　按个体随机取样群体遗传参数

Table 3　Genetic parameters of random sampling individuals

取样比例 Sampling proportion	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态性位点百分率 P (％)	群体总的基因多样度 Ht	捕获等位基因数 No. of alleles captured
0.1	33	39.75	0.15	108
0.15	42	50.6	0.19	121
0.2	45	54.21	0.2	128
0.25	41	49.39	0.18	124
0.3	49	59.04	0.2	132
0.35	47	56.62	0.2	130
0.4	48	57.83	0.21	125
0.45	48	57.83	0.19	129
0.5	49	59.04	0.2	132
0.55	50	60.24	0.21	133
0.6	50	60.24	0.21	131
0.65	52	62.65	0.21	135
0.7	51	61.44	0.21	134

2.1.3　取样个体空间距离　为保证获取不同的遗传组成个体、避免同一个体后代的重复取样从而降低取样效率，需要首先分析单个群体内夏蜡梅遗传变异的空间分布，以明确取样间隔距离。本研究以横源群体为例进行夏蜡梅遗传变异的空间自相关分析，运用等地理距离间隔法计算两居群不同距离等级下的 Moran′s *I* 空间自相关系数，结果见表 4。

横源群体共得到 ISSR 多态位点数 29 个，选取 21 个谱带频率在 30％～70％的位点，以个体间平均距离（26 m）为梯度划分 10 个距离等级。如表 4 所示，在计算出的 210 个 Moran′s *I* 值中，有 20 个（9.5％）达到显著（$P<0.05$）或极显著（$P<0.01$）相关水平，在 10 个距离等级中未有一个等级距离显著性 *I* 值比例超过 30％，夏蜡梅群体内遗传变异分布的空间结构性不强。但在最短距离（26 m）内，仍有 5 个统计检验达显著的 *I* 值（占 23.8％）为正值，因此在采样过程中应保持一定的个体间隔距离。

表4　横源群体10个距离等级下的 Moran′s *I* 值及其显著性

Table 4　Spatial autocorrelation coefficients（Moran′s *I*）for ten distance classes in population P3 of *S. chinensis*

位点 Locus	10 种距离等级 Moran′s *I* 值 Morans *I* for 10 distance classes#									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
807-1	0.0003	0.0005	0.0008	0.001	0.0013	0.0015	0.0018	0.0021	0.0023	0.0026
807-2	-0.05	0.015	-0.0136	0	0.122	-0.056	-0.0937	-0.275	0.1326	-0.3004
807-4	0.1952*	-0.1268	0.4289***	-0.3048	-0.5561*	-0.2232	0.0141	-0.2577	-0.0086	-0.1787
807-6	-0.0256	-0.1592	-0.1122	0.1154	-0.1236	-0.0589	0.0805	0.0689	-0.0344	-0.002
807-7	-0.069	-0.0206	0.2231*	-0.1905	-0.2997	-0.2577	0.0659	0.0668	-0.0725	-0.0551
808-1	-0.0064	-0.1763	0.2595*	-0.1154	-0.044	0.0108	0.0108	-0.0798	-0.151	0.0567
808-2	0.0194	-0.1498	0.0061	-0.2	0.1853	0.0825	-0.2196	0.0231	0.0051	0.0599
808-3	0.0584	-0.1569	0.2336*	-0.2662	-0.2468	-0.0938	-0.1291	-0.1008	0.0315	0.0407
808-7	0.1282	-0.0047	-0.135	-0.2308	0.0357	0.2432	0.1386	-0.1913	-0.151	-0.1781
809-3	0.025	-0.072	-0.0057	0.04	0.0979	-0.1209	-0.0122	-0.159	-0.0045	-0.0842
817-1	0.2887***	-0.0015	-0.1017	-0.2738	-0.6054*	0.4241**	-0.1962	-0.0851	-0.1859	-0.2005
826-4	-0.0542	-0.1077	0.0308	-0.2083	-0.0506	0.0799	-0.0258	0.0573	-0.0189	-0.0461
826-5	0.087	0.0734	-0.2795	-0.1304	0.1558	0.3134*	-0.0543	-0.3696*	-0.0967	0.1945
835-4	0.1429	0.1281	0.0569	0.1429	-0.1714	0.1091	-0.124	0.0806	-0.3343**	-0.7892***
835-5	0.1591	-0.015	-0.1276	-0.0325	0.1568	-0.0408	-0.1291	-0.4068**	-0.0163	0.2488
835-9	0	0.0339	0.1097	0.1058	-0.034	-0.0589	-0.3552*	0.1084	-0.2072	-0.0461
840-4	0.3157**	-0.2361	-0.0973	-0.4293*	-0.4246	-0.1304	0.3777**	-0.0626	-0.0709	0.2334
841-1	0.3875***	-0.0631	-0.0876	-0.1667	0.0357	-0.1315	0.0573	-0.1542	-0.1884	-0.1732
841-2	0.0128	0.0525	-0.0667	-0.0769	-0.044	-0.0589	0.0457	-0.2192	-0.0011	-0.1781
841-3	0.3875***	-0.0631	-0.0876	-0.1667	0.0357	-0.1315	0.0573	-0.1542	-0.1884	-0.1732
841-5	-0.1357	0.1303	-0.101	0.1524	-0.1616	0.0616	-0.2534	-0.0299	0.0141	-0.2586

* $P<0.05$，** $P<0.01$，*** $P<0.001$.

距离等级（Distance classes）（单位：m；Unit ：m）：1. 0－26 m；2. 26－52 m；3. 52－78 m；4. 78－104 m；5. 104－130 m；6. 130－156 m；7. 156－182 m；8. 182－208 m；9. 208－234 m；10. 234－260 m

表5　横源群体中表现显著相关性的位点数

Table 5　Number of loci which showed significant correlation in population P3

	距离等级 Distance classes									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
显著正相关的位点个数 No. of loci which showed significant positive correlation	5	0	4	0	0	2	1	0	0	0
显著负相关的位点个数 No. of loci which showed significant negative correlation	0	0	0	1	2	0	1	2	1	1
显著相关性位点所占比例 The percent of loci which showed significant correlation（％）	23.8	0	19	4.8	9.5	9.5	9.5	9.5	4.8	4.8

综合以上研究，夏蜡梅迁地保护取样 6 个群体，每群体抽样比例在 30%（每群体取 9～10 株）可代表夏蜡梅天然群体 95%以上的遗传组成，居群取样时应考虑种群内遗传变异的空间分布模式，保持一定的取样个体间隔距离。

2.2 取样策略的评价分析

实际操作中，为避免漏选或收集后代遗传多样性偏低，可先放宽收集，待建立收集资源圃基础之后再进一步决定筛除或补充，这是实施濒危植物迁地保护必要的环节（许再富，2008）。通过对不同取样居群与个体数后代群体的遗传多样性分析，分析取样居群与个体数对各遗传参数的影响，结果正验证了上述取样策略的正确性。表 6 显示，以每居群采样 20 个单株种子播种，随着采种居群数增加，无论是观测等位基因数、有效等位基因数或是多态性位点数、Nei′s 基因多样性指数（*h*）、Shanon′s 指数（*I*）均呈增加趋势，采种 6 个群体，Nei′s 基因多样性指数（*h*）、Shanon′s 指数（*I*）对野生群体的保留率均已超过 90%，由此可见取样策略中 6 群体取样是有效而可行的。

同样，以采种 8 个居群，每居群随采种个体数的增加，各遗传参数均呈增加趋势。采种 10 个个体，Nei′s 基因多样性指数（*h*）、Shannon′s 指数（*I*）对野生群体的保留率分别达到 96.67% 和 95.12%，取样策略中每居群 10 个个体的取样能够较好地保留原始群体的遗传多样性。

3 讨论

3.1 取样的理论依据

遗传多样性取样策略明确在进行种质采集时，既要考虑使获取样本包含尽可能多的遗传变异，又须使样本数量在可控制的范围之内（金燕和卢宝荣，2003）。种质取样保存的多少取决于种内遗传多样性水平及分布状况，取样的居群数理论上应覆盖整个分布区域并尽可能包含整体种群分布的生态梯度，以最大限度的代表整个天然种群；基于哈迪-温伯格平衡（Hardy-weinberg Equilibrium）提出的假设模型认为若使样本包含种群 95%以上的遗传变异或保存基因频率小于 0.05 的稀有等位基因则居群内取样数至少要达到 30 个个体（Sjögren and Wyöni，1994）；而对

表6 采种居群数对后代群体遗传参数影响

Table 6 Influence of sampling population number on genetic index of offspring population

居群数 No. of populations	观测等位基因数 *Na*	有效等位基因数 *Ne*	多态性位点数 No. of polymorphic loci	多态性位点百分率 *P*（%）	Nei′s 基因多样性指数 *h*	Shannon′s 指数 *I*
6	1.55	1.26	46	55.42	0.16	0.25
保留率 Conserved percentage（%）	94.84	99.26	86.79	86.78	95.32	94.34
7	1.56	1.27	47	56.63	0.16	0.26
保留率 Conserved percentage（%）	95.58	99.93	88.67	88.67	98.13	96.79
8	1.58	1.28	48	57.83	0.17	0.26
保留率 Conserved percentage（%）	96.32	100.59	90.56	90.56	100.81	99.29

表7 每居群采种个体数对后代群体遗传参数影响

Table 7 Influence of sampling individual proportion on genetic index of offspring population

个体数 No. of individuals	观测等位基因数 *Na*	有效等位基因数 *Ne*	多态性位点数 No. of polymorphic loci	多态性位点百分率 *P*（%）	Nei′s 基因多样性指数 *h*	Shannon′s 指数 *I*
10	1.55	1.27	45.6	54.94	0.16	0.25
保留率 Conserved percentage（%）	94.7	99.7	86.04	86.04	96.67	95.12
20	1.58	1.28	48	57.83	0.17	0.26
保留率 Conserved percentage（%）	96.32	100.59	90.56	90.56	100.81	99.29

不同遗传分化与空间遗传结构的物种，取样居群数与个体数各有侧重，对于群体间较高遗传分化而变异主要存在于居群内、遗传变异的空间结构不显著的物种则应加大取样居群数以及居群内取样个体数（李昂等，2002）。

3.2 取样策略制定参数与方法

野生植物分布于一定的居群范围，相比栽培作物可获得的性状数据非常有限，如何掌握充分的群体信息'档案'获取遗传变异数据，并在此基础上制定相应的种质收集保存策略，是野生濒危植物迁地保护中需要首先考虑的问题。文献报道中，有以等位酶电泳分析数据（罗建勋等，2007）、表型与分子标记数据相结合的（张睿鹂等，2008）以及单纯采用 ISSR 分子标记数据进行野生群体遗传多样性分析对比（Jin 等，2003），建立针对不同植物的取样策略。

相对于表型性状，分子标记数据受环境影响较小，并且随着分子标记技术的改进，能够提供的信息量也在不断增多，从最初的等位酶标记一直发展到 RAPD、SSR、ISSR 以及 AFLP 等分子标记技术被相继采用以获取群体遗传多样性数据资料（周世良和叶文国，2002；Martins 等，2003）。表型更多反映的是获得表达基因所控制的性状，而分子标记提供的一些稀有基因信息可能并未表现在表型性状上，但在收集保护中也应给予重视，毕竟保留更多变异有助于提高种的环境适合度、减少灭绝风险（Hedrick and Kalinowski，2000）。实际制定采样策略时，可综合考虑表型与分子标记分析数据，二者间相互对照。以夏蜡梅为例，保留 6 个夏蜡梅居群进行取样，应优先选择表型变异丰富的居群，天台大雷山群体的夏蜡梅（P8）变异系数最高（陈香波等，2010），与近临安夏蜡梅居群（P1～P7）距离较远成间隔分布，居群聚类分析与其它群体遗传距离也最远，因此 P8 居群应作为优先取样群体，而对地理距离较近的临安顺溪横源（P3）与直源群体（P6）、大明山西坑（P1）与大明山景区群体（P2），则考虑保留表型丰富、遗传多样性较高的 P3 与 P2 群体进行取样。综合分析认定，天台大雷山（P8）、大明山景区（P2）、顺溪乡横源（P3）、颊口镇前坑（P4）、清凉峰马啸（P5）、安徽龙须山（P7）这 6 个群体作为遗传多样性迁地保护的样本群体进行取样，这样既保留了夏蜡梅不同花色类型（白、浅粉、粉、粉红），同时也保留了遗传分化较为明显的两大类群（天台与近临安群体）。

取样居群确定以后，根据前述有关理论居群内取样个体数至少应保持 30 个以上（居群规模偏小者除外），本研究每群体采取了 30 个个体（天台群体 15 株）共计 255 株构建初始取样群体，获取代表群体总的 ISSR 分子标记变异数据，在此基础上计算机模拟随机取样分析，计算结果捕获 95％的等位基因的个体取样比例应在 30％，在初始取样数量上进一步筛除，符合以最少的取样数量代表最大程度遗传多样性的收集宗旨。

同样是计算机模拟取样，根据等位酶数据结果计算出夏蜡梅个体取样比例在 35％时可捕获 95％的等位基因（李正宏，2005），与本研究 30％比例结果非常接近，可见当原始样本群体足够大时，无论是共显性标记（等位酶）或是显性标记（ISSR）捕获等位基因增加趋缓时的个体数量比例相当，此时标记方法对其的影响已非常有限。

在个别针对野生分布植物的核心种质构建中，多以 PopGene1.32 进行取样分析，确定保存数时是经多次随机抽取不同比例的群体或个体（一般 10 次）分别计算群体多样性指标（赵冰，2008；宋丛文和包满珠，2005）再取平均值，分析数量（重复数）偏少，而以 PGDC1.0 软件分析，每一抽样比例下模拟野外随机取样，可以产生 1000 个随机样本，因为样本数量足够大，从而各项遗传指标的平均数就比较稳定，降低了因为取样次数少而产生波动的误差，因此，该取样方法相对更加科学合理，应该在更多濒危植物迁地保护取样时加以采用，以提高取样的精确度和取样效率。

3.3 取样后代群体的评价分析

本研究中，原始群体与种子采样后建立起的人工群体遗传变化趋势非常相近，即随着取样居群数与居群内取样个体数增加，包括多态性位点百分率（P）、群体总的基因多样度（Ht）/$Nei's$ 基因多样性指数（h）等在内的遗传参数均呈增加的趋势，测得对于原始群体的遗传变异保留率超过 90％的群体与个体数与先前制定的取样策略完全吻合，验证了该遗传多样性取样策略的科学可行性。

当然取样保存只是实施迁地保护工程的第一步，并不意味着全部工作的结束，后续工作中还需对所建立起的迁地保护居群的遗传多样性进行动态跟踪与监测（韦霄等，2005），决定补充或者完善。

华东地区重要的珍稀濒危植物—夏蜡梅能够在上海辰山植物园落户、实现遗传多样性迁地保护，其意义非常重要。通过这一种植物建立起的遗传多样性取样保护模式，可为更多濒危植物迁地保护提供参照与技术借鉴，也是向“华东区域性珍稀濒危植物保育”目标更迈进了一步。

〔参 考 文 献〕

许再富，1998. 稀有濒危植物迁地保护的原理与方法. 昆明：云南科技出版社

李正宏，2005. 濒危植物取样策略研究［D］. 杭州：浙江大学

赵冰，2008. 蜡梅种质遗传多样性与核心种质构建的研究［D］. 北京：北京林业大学

Chen XB（陈香波），Ye WG（叶文国），Tian Q（田旗）*et al*.，2010. Phenotypic variation and distribution pattern of natural populations of *Sinocalycanthus chinensis*［J］. *Journal of Beijing Forestry University*（北京林业大学学报），**32**（2）：133—140

Doyle JJ，Doyle JL，1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue［J］. *Focus*，**12**：13—15

He JS（何敬胜），Li ZZ（李作洲），Huang HW（黄宏文），2005. Spatial autocorrelation of allozyme genetic variation of the endangered *Manglietia patungensis*（Magnoliaceae）［J］. *Acta Botanica Yunnanica*（云南植物研究），**27**（2）：171—180

Hedrick PW，Kalinowski ST，2000. Inbreeding depression in conservation biology［J］. *Annual Review of Ecology & Sysematics*，**31**：139—162

Jin Y（金燕），Lu BR（卢宝荣），2003. Sampling strategy for genetic diversity［J］. *Biodiversity Science*（生物多样性），**11**（2）：155—161

Jin Y，Zhang WJ，Fu DX *et al*.，2003. Sample stragety within a wild soybean population based on its genetic variation detected by ISSR markers［J］. *Acta Botanica Sinica*（植物学报），**45**（8）：995—1002

Jin ZX（金则新），Li JM（李钧敏），2007. ISSR analysis on genetic diversty of endangered relic shrub *Sinocalycanthus chinensis*［J］. *Chinese Journal of Applied Ecology*（应用生态学报），**18**（2）：247—253

Kang M（康明），Ye QG（叶其刚），Huang HW（黄宏文），2005. Genetic risks in plant *ex-situ* conservation［J］. *Hereditas*（遗传），**27**（1）：160—166

Li A（李昂），Luo YB（罗毅波），Ge S（葛颂），2002. Spatial autocorrelation study of population genetic structure of two orchid species［J］. *Biodiversity Science*（生物多样性），**10**（3）：249—257

Li Q，Xu Z，He T，2002. *Ex-situ* genetic conservation of endangered *Vatica guangxiensis*（Diperocaropaceae）in China［J］. *Biological Conservation*，**106**：161—166

Li ZH（李正宏），Qiu YX（邱英雄），Xu HM（徐海明）*et al*.，2006. Study on the best sampling proportion for the core accessions of the endangered species by Monte Cario method［J］. *Journal of Zhejiang University*（Agric &Life Sci）（浙江大学学报（农业与生命科学版），**32**（4）：455—459

Luo JX（罗建勋），Gu WC（顾万春），Chen SY（陈少瑜），2007. Gene differentiation in natural population of *Picea asperata* and sampling strategies for Ex situ germplasm resource conservation［J］. *Journal of Southwest Forestry College*（西南林学院学报），**27**（1）：5—10

Martins M，Tenreiro R，Oliveira MM，2003. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers［J］. *Plant Cell Reports*，**22**（1）：71—78

Sjögren P，Wyöni PI，1994. Conservation genetics and detection of rare alleles in finit populations［J］. *Conservation Biology*，**8**（1）：267—270

Song CW（宋丛文），Bao MZ（包满珠），2005. Sampling strategy for preservation of germplasm from *Davidia involucrate*［J］. *Acta Phytoecologica Sinica*（植物生态学报），**29**（3）：422—428

Wei X（韦霄），Wei JQ（韦记青），Jiang SY（蒋水元）*et al*.，2005. Genetic diversity evaluation of ex-situ populations of *Camellia nitidssima*［J］. *Guihaia*（广西植物），**5**：215—218

Xu ZF（许再富），Huang JY（黄加元），Hu HB（胡华斌）*et al*.，2008. A commentary on plant ex situ conservation and its researches in China nearly thirty years［J］. *Guihaia*（广西植物），**28**（6）：764—774

Yeh FC，Yang Boyle T，1999. POPGENE. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis［CP/DK］. Release l. 31 University of Alberta，Edmonton

Zhang RL（张睿鹂），Jia Y（贾茵），Zhang QX（张启翔），2008. Phenotypic variation of natural populations of *Primula denticulate* ssp. *sinodenticulata*［J］. *Biodiversity Science*（生物多样性），**16**（4）：362—368

Zhang WB（张文标），Jin ZX（金则新），Li JM（李钧敏），2007. Genetiv diversity of *Calycanthus chinensis* in four different habitats revealed by RAPD［J］. *Bullitin of Botanical Research*（植物研究），**27**（3）：313—318

Zheng WJ（郑万钧），Zhang SR（章绍尧），1964. A new genus of Calycanthaceae-Sinocalycanthus［J］. *Acta Phytotaxonomica Sinica*（植物分类学报），**9**（2）：135—139

Zhou SL（周世良），Ye WG（叶文国），2002. The genetic diversity and conservation of *Sinocalycanthus chinensis*［J］. *Biodiversity Science*（生物多样性），**10**（1）：1—6